

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DESAIX, Anne
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, Rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

Date of mailing (day/month/year) 25 September 2006 (25.09.2006)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference B6423AA-FP	
International application No. PCT/EP2005/013021	International filing date (day/month/year) 18 November 2005 (18.11.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input checked="" type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address DESAIX, Anne Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A. 3, Rue Chauveau-Lagarde F-75008 Paris France	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 01 44 51 18 00	
	Facsimile No. 01 42 66 08 90	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality		
<input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address DESAIX, Anne Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A. 3, Rue Auber F-75009 Paris France	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 01 44 51 18 00	
	Facsimile No. 01 42 66 08 90	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Tartabull Lorenzo
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 82 70
	Telephone No. +41 22 338 90 99

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To:

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD SA
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 17 March 2006 (17.03.2006)	
Applicant's or agent's file reference B6423AA-FP	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2005/013021	International filing date (day/month/year) 18 November 2005 (18.11.2005)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 24 November 2004 (24.11.2004)
Applicant BIO-RAD PASTEUR et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
24 November 2004 (24.11.2004)	0412471	FR	NR
29 November 2004 (29.11.2004)	10/998,175	US	07 March 2006 (07.03.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Carlos Roy - Gijsbertus Beijer

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Telephone No. +41 22 338 95 61

10/574581

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP2005/013021

International filing date: 18 November 2005 (18.11.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US
Number: 10/998,175
Filing date: 29 November 2004 (29.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 March 2006 (07.03.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

10/574581
PCT/EP200 5/ 013021

EPO - DG 1

07.02.2006

(76)

PA 1416331

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

January 24, 2006

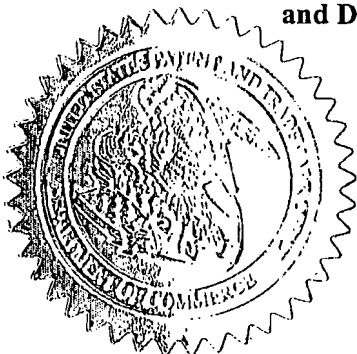
THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 10/998,175

FILING DATE: November 29, 2004

THE COUNTRY CODE AND NUMBER OF YOUR PRIORITY
APPLICATION, TO BE USED FOR FILING ABROAD UNDER THE PARIS
CONVENTION, IS US10/998,175

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



M. SIAS
Certifying Officer

3. Inventor: Claire (first) MI LAMOURE (last) French (citizenship)
Residence: (city) VIROFLAY (state/country) France
Mailing Address: 5, rue Raphael Corby, VIROFLAY, France
(Zip Code) 78220
4. Inventor: Franck (first) MI MOLINA (last) French (citizenship)
Residence: (city) LES MATELLES (state/country) France
Mailing Address: 2, Chemin des Combelles, LES MATELLES, France
(Zip Code) 34270

NOTE: FOR ADDITIONAL INVENTORS, check box ☐ and attach sheet with same information and signature and date for each.

Procédé, installation et programme d'ordinateur pour
estimer l'effectif initial d'une population d'acides
nucléiques, notamment par PCR

5 La présente invention concerne l'estimation de l'effectif initial d'une population d'intérêt dans un échantillon soumis à succession de réactions d'amplification.

La présente invention trouve une application avantageuse
10 mais aucunement limitative à la détermination d'une quantité initiale d'acides nucléiques dans un échantillon soumis à une réaction de PCR (pour "Polymerase Chain Reaction"), en temps réel. Une technique de ce type, dite
15 "de quantification par PCR", est utilisée notamment pour évaluer le nombre de copies d'agents pathogènes (par exemple du Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH) dans un prélèvement de fluides corporels d'un patient, typiquement dans le cadre d'un suivi médical.

20 On se réfère à la figure 1 pour décrire brièvement l'allure schématique d'une courbe d'amplification par PCR en temps réel, avec, en abscisses, des indices de cycles de PCR et, en ordonnées, dans l'exemple représenté, des quantités de fluorescence émises (en unité arbitraire) et
25 mesurées à chaque cycle de PCR. On indique qu'à chaque cycle de PCR, l'échantillon subit des variations de température permettant à l'ADN polymérase de procéder à l'amplification des acides nucléiques et les produits PCR correspondants sont détectés par des molécules
30 fluorescentes. On obtient, en reportant la quantité de fluorescence mesurée F_n en fonction du nombre n de cycle

de PCR, une variation du type représenté sur la figure 1 et comprenant au moins :

- une première partie BDF où les mesures de fluorescence se confondent sensiblement avec un bruit de fond de l'appareil de mesure de fluorescence,
- une seconde partie EXP où les quantités de fluorescence mesurées croissent de façon sensiblement exponentielle,
- une troisième partie LIN où la croissance des quantités de fluorescence mesurées est sensiblement atténuée et se comporte globalement de façon sensiblement linéaire, et
- une quatrième partie PLA où les mesures de fluorescence atteignent une phase de plateau.

On retiendra en fait que pour les premiers cycles de PCR (première et seconde parties), la population d'intérêt croît sensiblement de façon exponentielle, tandis que pour les cycles qui suivent (troisième et quatrième parties), d'autres phénomènes entrent en compétition avec la croissance de la population d'intérêt, cette croissance étant alors amortie jusqu'à la phase de plateau PLA.

On connaît notamment par le document :

"*Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves*", de R.G.Rutledge et C.Côté, dans *Nucleic Acids Research*, 2003, vol.31, N°16, une méthode pour estimer la quantité initiale, inconnue, d'acides nucléiques dans un échantillon d'intérêt, par PCR. Elle consiste à utiliser plusieurs échantillons de quantités initiales connues en acides nucléiques, dits "standards", pour déterminer, par interpolation, la

quantité initiale d'acides nucléiques présents dans l'échantillon d'intérêt.

De façon générale, plus la quantité initiale en acides nucléiques dans un échantillon est élevée, et plus tôt la quantité de produit PCR obtenue et, par conséquent, la fluorescence émise deviendront détectables. En se référant à la figure 2 relative à l'art antérieur, on comprendra que la population initiale dans le standard St1 est plus élevée que celle du standard St2, laquelle est plus élevée encore que celle du standard St3, etc, car le cycle Ct1 pour le standard St1 intervient avant le cycle Ct2 correspondant pour le standard St2, lequel intervient encore avant le cycle Ct3 du standard St3, etc.

Ainsi, ce cycle Ct, correspondant au cycle auquel la mesure de fluorescence atteint un seuil de fluorescence THR (comme représenté sur la figure 2), préfixé arbitrairement (typiquement au-dessus du bruit de fond), se présente comme un paramètre représentatif de l'effectif initial N_0 d'une population d'acides nucléiques soumise aux cycles de PCR. Cette observation a été mise à profit dans l'art antérieur cité ci-avant pour établir une dépendance telle que représentée sur la figure 3 entre les numéros de cycle Ct1, Ct2, Ct3, Ct4, pour plusieurs standards d'effectifs initiaux connus, et leur effectif initial N_0^1 , N_0^2 , N_0^3 , N_0^4 . En reportant ainsi les cycles Ct1, Ct2, Ct3, Ct4, etc, en ordonnées et le logarithme des effectifs initiaux N_0^1 , N_0^2 , N_0^3 , N_0^4 en abscisses, on obtient une pente de régression REG. Sur cette pente REG, on reporte (flèche F1 en traits pointillés) le cycle Ctint

déecté pour l'échantillon d'intérêt. Par interpolation sur la pente de régression REG (flèche F2 en traits pointillés), on détermine ensuite l'effectif initial N_0^{int} de la population dans l'échantillon d'intérêt.

5

Cette méthode, même si elle s'est largement répandue, présente néanmoins quelques inconvénients.

10

Tout d'abord, elle nécessite l'utilisation de plusieurs échantillons standard d'effectifs initiaux respectifs connus.

15

Ensuite, la méthode dépend du jugé de l'utilisateur car la valeur du seuil de fluorescence qui est choisie par l'utilisateur influence directement la valeur des cycles C_t des courbes d'amplification et, par conséquent, la valeur estimée de l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt. La valeur du seuil a également un impact sur la précision du résultat car la précision est généralement meilleure si le seuil est choisi dans la phase EXP de croissance exponentielle des courbes d'amplification. Toutefois, en pratique, il est difficile pour l'utilisateur de savoir si le niveau seuil de fluorescence fixé THR correspond bien à la phase exponentielle des courbes, et ce, pour tous les échantillons (les échantillons standard et l'échantillon d'intérêt).

20

Enfin, la méthode sous-entend, sans aucune vérification, que la population a le même rendement d'amplification dans l'échantillon d'intérêt et dans tous les échantillons standard. Ainsi, si typiquement l'échantillon d'intérêt

25

30

contient des inhibiteurs de PCR, son résultat sera faussement abaissé.

On retiendra donc que la technique de l'art antérieur
5 dépend du seuil de fluorescence THR défini par l'utilisateur. La valeur choisie influence les valeurs des cycles Ct et par conséquent la détermination de la quantité initiale dans l'échantillon d'intérêt. C'est l'une des raisons pour lesquelles de nombreux travaux ont
10 cherché récemment à automatiser et à fiabiliser la détection du cycle Ct.

La présente invention vient améliorer la situation en proposant une approche complètement différente.

15 Elle vise tout d'abord un procédé, ce procédé étant mis en œuvre par des moyens informatiques pour quantifier, de façon absolue et/ou relative, une population initiale d'acides nucléiques dans un échantillon d'intérêt. Cet
20 échantillon est soumis à une succession d'applications d'une réaction d'amplification de la population d'intérêt. De façon très générale, cette amplification peut être menée par cycles successifs de PCR, mais aussi par toute autre technique d'amplification. On retiendra surtout que
25 cette amplification doit simplement être définie par un rendement de réaction, comme on le verra plus loin. Au cours de ces amplifications successives, on relève des mesures expérimentales représentatives d'un effectif courant de la population au moins dans l'échantillon
30 d'intérêt. On comprendra que l'on peut relever une ou

plusieurs mesures après ou pendant chaque réaction d'amplification, sans perte de généralité.

5 Selon une définition actuellement préférée de l'invention, le procédé au sens de l'invention comporte les étapes suivantes :

a) prévoir un modèle de rendement de la réaction d'amplification en fonction de la succession d'amplifications, ce modèle comportant :

- 10 o une phase sensiblement constante pour une première partie des applications de la réaction, et
 o une phase non constante pour une seconde partie des applications de la réaction,

15 les première et seconde parties étant séparées par une région de basculement du rendement entre les phases constante et non constante, incluant un indice d'application correspondant sensiblement au basculement,

20 b) exprimer, en utilisant le modèle de rendement, une relation faisant intervenir au moins l'indice de basculement et un paramètre représentant l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt,

25 c) par comparaison avec les mesures expérimentales, déterminer au moins l'indice de basculement, et, dans une étape d) ultérieure ou conjointe, en déduire l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt.

30 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée du mode de réalisation donné ci-après à titre d'exemple, en s'appuyant sur les graphiques annexés et sur lesquels :

- outre la figure 1, relative à l'art antérieur, représentant une variation de la quantité de fluorescence mesurée en fonction d'un nombre de cycles de PCR, décrite ci-avant ;
- 5 - outre la figure 2, relative à l'art antérieur, représentant les quantités de fluorescence émises et croissantes en fonction du nombre de cycles de PCR, et décrite ci-avant ;
- outre la figure 3 représentant une méthode
10 d'interpolation pour déterminer la quantité initiale de la population d'intérêt dans l'échantillon d'intérêt, selon une méthode connue de l'art antérieur, et décrite ci-avant ;
- la figure 4A représente une variation schématique des
15 mesures expérimentales précitées en fonction de la succession d'amplifications que l'on applique à l'échantillon d'intérêt,
- la figure 4B représente une variation schématique du
20 rendement de la réaction d'amplification, obtenue à partir des mesures expérimentales, en fonction de la succession d'amplifications appliquées à l'échantillon d'intérêt,
- la figure 5 représente une régression entre des indices
25 de basculement du rendement entre la phase constante et la phase non constante et le logarithme des effectifs initiaux pour des échantillons standard et pour l'échantillon d'intérêt, pour la mise en œuvre d'un premier mode de réalisation,
- la figure 6A représente une variation typique de la
30 quantité de fluorescence mesurée et ajustée en tenant

compte d'un bruit de fond propre aux mesures, en fonction du nombre de cycles n de la réaction PCR,

- la figure 6B représente une variation de l'efficacité de la PCR de la figure 6A, en fonction du nombre de cycles n ,
- la figure 7 représente une comparaison de la variation expérimentale de la fluorescence émise selon la figure 6A et le résultat obtenu par l'application du modèle de la fluorescence émise obtenu par intégration d'un modèle d'efficacité, selon un second mode de réalisation,
- la figure 8 représente une comparaison de la variation de l'efficacité de la figure 6B avec l'application d'un modèle d'efficacité, déduit de la modélisation de la fluorescence émise de la figure 7,
- la figure 9 représente l'organigramme schématisant les principales étapes du procédé selon le mode de réalisation proposé pour la présente invention, et
- la figure 10 représente une installation pour quantifier la population initiale d'un échantillon d'intérêt.

On s'appuie sur les figures 4A et 4B pour décrire brièvement quelques principes de l'invention illustrant les caractéristiques du procédé ci-avant.

Tout d'abord on indique que la figure 4A représente une succession de mesures expérimentales F_n représentatives de l'effectif courant d'une population d'intérêt qui subit progressivement une succession de réactions d'amplification, chaque réaction étant indexée par un

indice n . Cette succession de réactions correspond, dans l'exemple décrit ici à titre non limitatif, à une succession de cycles de PCR. Les mesures expérimentales F_n correspondent dans cet exemple à titre non limitatif à des mesures de quantités de fluorescence à chaque cycle de PCR. Ainsi, dans le cadre d'une méthode de quantification qui combine la réaction PCR et la fluorescence émise par l'échantillon d'intérêt, on introduit des réactifs fluorescents dans l'échantillon, de sorte que la fluorescence émise, au cours d'un cycle de PCR, est proportionnelle à l'effectif d'acides nucléiques dans cet échantillon. Néanmoins, cette réalisation admet de nombreuses variantes. Déjà, il peut être préféré de mener plusieurs mesures ou aucune mesure pour certains cycles de PCR. Par ailleurs, plus généralement, la méthode de mesure peut utiliser d'autres techniques que la fluorescence, même si cette dernière est souvent celle employée dans la quantification par PCR. Enfin, on indique que d'autres techniques d'amplification peuvent être prévues dans le cadre de la présente invention, dès lors qu'il est possible de suivre la variation du rendement de la réaction correspondant à cette amplification. Néanmoins, comme l'exemple décrit ci-après traite préférentiellement de cycles de PCR, on parlera d'"efficacité de la PCR", notée E_n pour chaque cycle de PCR d'indice n , pour désigner le rendement de la réaction d'amplification.

Comme indiqué ci-avant en référence à la figure 1, on retrouve sur la figure 4A principalement deux régions où :

- pendant les premiers cycles de PCR (partie EXP), la population croît sensiblement de façon exponentielle,

- tandis que pour les cycles qui suivent (partie LIN et PLA), d'autres phénomènes entrent en compétition avec la croissance de la population d'intérêt, cette croissance étant alors amortie.

5

On formule alors les hypothèses suivantes :

- le rendement de la réaction E_n est relativement constant durant les premiers cycles sur la partie EXP, et
 - à partir d'un certain nombre de cycles effectués, le
- 10 rendement E_n de la réaction décroît sur la partie LIN et PLA.

Cette décroissance du rendement peut avoir diverses explications, notamment une dégradation et/ou une carence des réactifs de PCR (DNA polymérase, dNTPs, amorces, ou

15 autres) et/ou une inhibition par les produits formés eux-mêmes.

On fait ainsi l'hypothèse ici que le rendement est d'abord constant et décroît ensuite. Toutefois, on comprendra que

20 l'invention s'applique de façon plus générale dans le cadre d'un rendement :

- d'abord constant, ce qui correspond à une situation normale de croissance par amplification,
 - puis non constant (décroissant ou croissant), ce qui
- 25 correspond à une situation sensiblement anormale.

On a constaté que dans le cadre de réactions d'amplification de quantité d'acides nucléiques, le rendement bascule souvent d'une phase constante à une

30 phase non constante. Cette observation a été mise à profit au sens de l'invention pour en déduire la quantité

- initiale d'acides nucléiques, comme on le verra en détail ci-après. Auparavant, on indique simplement que le rendement peut encore basculer d'une phase non constante pour les premiers cycles à une phase constante ensuite. La
- 5 présente invention s'applique tout aussi bien à ce cas. De manière générale, on retiendra donc que l'on détecte, au sens de l'invention, un basculement du rendement; d'une phase constante à une phase non constante.
- 10 On rappelle que le but recherché est de donner l'effectif initial de la population soumise à amplification. Déjà, en se référant à la figure 4A, on comprendra que la mesure F_0 représentative de cet effectif initial, pratiquement confondue avec le bruit de fond des mesures BDF ne permet
- 15 pas directement d'accéder, à elle seule, à l'effectif initial. Dans l'art antérieur, on a recherché à quantifier cet effectif initial en exploitant la phase exponentielle, donc typiquement à la sortie du bruit de fond. On y détermine alors le cycle seuil C_t (correspondant au point
- 20 AA pour "art antérieur") de la figure 4A. Or, comme on l'a vu ci-avant, les mesures sont souvent bruitées dans cette région et il est difficile de déterminer avec précision un cycle seuil C_t de sortie du bruit de fond.
- 25 Dans une toute autre approche, la présente invention exploite plutôt la quasi-totalité des points de la courbe d'amplification pour déterminer précisément une région BAS où le rendement bascule entre une phase constante et une phase non constante, typiquement ici entre la phase
- 30 exponentielle EXP et la phase linéaire LIN. Déjà, on constatera que les mesures sont logiquement moins bruitées

dans cette région BAS que dans la région de sortie du bruit de fond puisque la région BAS intervient pour des cycles ultérieurs. De plus, notamment en raison des propriétés mathématiques liées au rendement, on verra plus loin que le nombre de standards qui peuvent être utilisés pour la quantification de l'effectif initial dans la population d'intérêt est, de façon très avantageuse, réduit par rapport au nombre de standards utilisés dans la quantification de l'art antérieur.

10

On décrit maintenant brièvement la relation qui peut lier la région de basculement BAS à l'effectif initial de la population d'intérêt. On rappelle au préalable que le rendement d'une réaction d'amplification est donné par :

15

$$N_{n+1} = N_n + E_n \cdot N_n, \text{ où :}$$

- N_n est l'effectif de la population d'intérêt après une amplification d'indice n dans une succession d'amplifications,
- N_{n+1} est l'effectif de la population d'intérêt après une amplification suivante, d'indice $n+1$, dans la succession d'amplifications précitée, et
- E_n est le rendement de la réaction d'amplification d'indice n dans la succession d'amplifications précitée.

25

En reformulant cette relation, par récurrence, on obtient :

$$N_{n+1} = (1 + E_n) (1 + E_{n-1}) (1 + E_{n-2}) \dots (1 + E_0) N_0,$$

où N_0 est l'effectif initial de la population d'intérêt.

Tant que le rendement E_n est constant, on comprendra que cette dernière relation peut s'écrire simplement :

30

$N_{n+1} = (1 + E_0)^{n+1} \cdot N_0$ (où l'indice $n+1$ n'a pas encore atteint la région de basculement BAS).

En effet, le rendement étant alors constant pour ces premiers cycles, on a :

5 $E_n = E_{n-1} = E_{n-2} = \dots = E_0,$

où E_0 est la valeur de la phase constante du rendement.

Néanmoins, lorsque l'indice $n+1$ dépasse la région de basculement BAS, la relation devient :

$N_{n+1} = N_0 \times (1 + E_0)^{C_{EEP}} \times \text{fonction}(C_{EEP}, n+1),$ où :

- 10 - $(C_{EEP} - 1)$ est le dernier indice de la réaction d'amplification au cours duquel le rendement est encore constant (on comprendra donc que l'indice C_{EEP} représente lui-même l'indice de basculement, proprement dit, entre la phase de exponentielle à la phase
- 15 linéaire),
- le terme $\text{fonction}(C_{EEP}, n+1)$ est une fonction particulière qui caractérise la phase non constante du rendement et qui dépend au moins de l'indice de basculement C_{EEP} et de l'indice courant de
- 20 l'amplification $n+1$.

On voit ainsi comment peuvent être liés l'indice de basculement C_{EEP} et l'effectif initial N_0 de la population d'intérêt. On comprendra qu'à ce stade, on a déjà réalisé

25 les étapes a) et b) du procédé tel que défini ci-avant.

Déjà, un premier mode de réalisation consiste à déterminer expérimentalement l'indice de basculement C_{EEP} et à le corréler à l'effectif initial, par régression, en

30 utilisant plusieurs échantillons standard qui subissent le même traitement d'amplification que l'échantillon

d'intérêt. Dans ce cas, on comprendra que les étapes b) et c) du procédé tel que défini ci-avant sont simplement inversées puisque l'on détermine expérimentalement, d'abord, l'indice de basculement C_{EEP} (étape c)) et que
 5 l'on détermine ensuite la relation entre l'indice C_{EEP} et l'effectif initial N_0 (étape b)) pour obtenir finalement l'effectif initial N_0 (étape d)).

Avant de décrire en détail toutes ces étapes au sens de ce premier mode de réalisation, on décrit un procédé de détermination de l'indice C_{EEP} , à partir des mesures expérimentales. En particulier, on comprendra que cette manière de déterminer expérimentalement l'indice C_{EEP} peut être appliquée à un autre mode de réalisation, différent
 15 du premier mode de réalisation précité.

En reprenant la relation entre l'efficacité E_n à un cycle donné n et l'effectif courant dans l'échantillon d'intérêt au même cycle N_n et à un cycle ultérieur N_{n+1} , on peut
 20 exprimer l'efficacité de l'amplification comme suit :

$$E_n = N_{n+1}/N_n - 1$$

Dans certains cas notamment où il n'est pas nécessaire de tenir compte du bruit de fond BDF dans les mesures, on
 25 peut en première approximation considérer que les mesures sont sensiblement proportionnelles à l'effectif courant dans l'échantillon d'intérêt. Toutefois, en pratique, on tiendra le plus souvent compte des dérives des mesures et, dans une réalisation qui sera décrite maintenant, on
 30 détermine des mesures expérimentales corrigées, notées

F'_n , à partir des mesures directes F_n telles que représentées sur la figure 4A.

Préférentiellement, on applique une étape préalable de traitement des mesures expérimentales F_n consistant à soustraire le bruit de fond BDF et à introduire ensuite une compensation pour tenir compte d'une mesure non nulle ε représentative de l'effectif initial. Dans l'exemple représenté sur la figure 4A, la variation du bruit de fond BDF en fonction de l'indice n peut être représentée par une fonction linéaire car les essais ont montré qu'un modèle linéaire est satisfaisant pour des mesures de fluorescence en PCR. Néanmoins, un modèle de variation exponentielle pourra être préféré dans certains cas. On applique en tout état de cause le modèle qui respecte le mieux la variation du bruit de fond BDF donnée typiquement par les premiers points de mesure. Ensuite, on soustrait le modèle BDF de variation de bruit de fond choisi à toutes les valeurs de mesures expérimentales F_n . En appliquant cette étape, on comprendra que la mesure de fluorescence théorique F_0 est ramenée à une valeur de mesure nulle, ce qui correspond à un effectif initial N_0 nul, ce qui n'a aucune réalité physique. Par conséquent, on applique avantageusement une compensation de cette correction comme suit :

$$F'_n = F_n - \text{BDF} + \varepsilon, \text{ où :}$$

- le terme F'_n correspond à une mesure corrigée pour un indice courant n ,
- le terme F_n correspond à la mesure expérimentale brute à cet indice courant n ,

- le terme BDF correspond à la valeur du bruit de fond modélisé pour l'indice courant n , et
- ϵ est le terme de compensation correspondant, supposé constant dans l'exemple décrit et représentant
5 directement en fait l'effectif initial N_0 .

Ces étapes de correction par rapport au bruit de fond, même si elles sont très avantageuses pour la détermination de l'indice de basculement C_{EEP} , peuvent être appliquées
10 par ailleurs à toute détermination et quantification de l'effectif initial N_0 dès lors qu'un bruit de fond est susceptible de fausser la mesure de cet effectif N_0 . A ce titre, ces étapes peuvent faire l'objet d'une protection séparée, le cas échéant.

15 Les mesures corrigées F'_n ainsi obtenues sont avantageusement proportionnelles aux effectifs courants N_n dans l'échantillon d'intérêt, de sorte que le rendement E_n peut maintenant s'exprimer directement en fonction des valeurs de mesure (corrigées comme indiqué ci-avant), par
20 la relation :

$$E_n = F'_{n+1}/F'_n - 1$$

Ainsi, à partir des mesures expérimentales F_n de la figure
25 4A, on obtient les mesures corrigées F'_n à partir desquelles on détermine ensuite la variation de l'efficacité E_n en fonction de la succession d'indices n , telle que représentée sur la figure 4B.

30 En bref, on exprime les mesures expérimentales sous la forme d'une variation expérimentale du rendement E_n telle

que représentée sur la figure 4B, en fonction de la succession d'applications n . On obtient alors une variation expérimentale du rendement, comportant :

- une première région sensiblement bruitée pour des indices d'applications n faibles (sensiblement avant le cycle CG dans l'exemple de la figure 4B),
- suivie d'une seconde région moins bruitée pour des indices d'applications plus élevés (au moins après la région de basculement BAS).

10

Au moins dans le cas le plus courant en amplification par PCR et en mesure par fluorescence, la phase non constante du rendement est décroissante et correspond à cette seconde région peu bruitée (comme représenté sur la figure 4B). Notamment pour éliminer des points de mesure qui risqueraient de fausser les résultats lorsque l'on choisit un modèle à appliquer à la variation du rendement :

- on estime une valeur grossière de la phase constante du rendement E_0 , et
- notamment pour la recherche de l'indice de basculement C_{EEP} , on ignore une partie au moins des mesures dans la seconde région moins bruitée et dont le rendement estimé est inférieur à une valeur seuil, telle que, par exemple, une fraction de la phase constante E_0 .

25

Ces points NEG (figure 4B) qui sont éliminés sont typiquement ceux correspondant à des indices d'amplification n très élevés et qui pourraient ne plus respecter le modèle qui a été choisi pour l'efficacité sensiblement autour de la région de basculement BAS. Pour les éliminer, on évaluera par exemple une moyenne de la

30

phase constante du rendement E_0 typiquement pour les premiers indices n . Ensuite, on choisira une valeur seuil correspondant à une fraction, par exemple 10%, de la moyenne trouvée pour la phase constante E_0 . Ensuite, en partant des indices n les plus élevés, on élimine tous les points de mesure NEG dont la mesure de rendement est inférieure ou égale à cette valeur seuil. Cette étape, très avantageuse pour la détection de l'indice C_{EEP} , peut néanmoins être appliquée à toute détermination basée sur le rendement E_n et, le cas échéant, peut faire l'objet d'une protection séparée.

Dans le cas d'une phase non constante du rendement qui est décroissante et qui suit la phase constante, comme représenté sur la figure 4B, on repère la région de basculement BAS, dans le sens des indices n décroissants à partir de la seconde région moins bruitée, en détectant un indice grossier CG dont le rendement dépasse une valeur prédéterminée. Ainsi, en se référant à la figure 4B, on va dans le sens des indices n décroissants en remontant vers la région de basculement BAS et on évalue le rendement associé à cet indice. Pour le premier point de mesure dont le rendement dépasse significativement la valeur prédéterminée précitée, on considère que l'indice grossier précité CG est détecté et correspond à l'indice de ce point de mesure.

Comme on le verra dans un mode de réalisation ultérieur, on peut modéliser, pour chaque point de mesure, la variation de son rendement comme si ce point correspondait effectivement à l'indice de basculement C_{EEP} . Dans cette

réalisation, on estime alors sa phase constante E_0 de rendement et si cette valeur estimée dépasse la valeur prédéterminée précitée, on considère ce point comme correspondant à l'indice grossier CG.

5

De façon générale, un rendement maximum a une valeur de 1 de sorte que l'on peut choisir la valeur prédéterminée précitée comme étant égale à 1. Néanmoins, ce choix admet des variantes et par exemple, il peut être prévu de fixer
10 cette valeur prédéterminée comme correspondant à la moyenne du rendement E_0 évaluée sur les premiers cycles de réaction.

Ensuite, on affine l'estimation de la valeur, qui peut
15 avantageusement être fractionnaire, de l'indice d'application C_{EEP} dans la région de basculement, dans le sens des indices d'applications croissants à partir de l'indice grossier CG, en détectant un indice d'application d'amplification dont le rendement vaut environ la valeur
20 prédéterminée précitée. Ainsi, en se référant à nouveau à la figure 4B, pour affiner la recherche de l'indice de basculement C_{EEP} après la détermination de l'indice grossier CG, on redescend à partir de l'indice grossier CG dans le sens des indices n croissants, par pas plus petit
25 qu'un indice entier et on détermine, par exemple par interpolation, l'abscisse pour laquelle on franchit la valeur prédéterminée. Typiquement, tant que la valeur de phase constante reste supérieure à 1, on poursuit la recherche dans le sens des n croissants et l'on détermine
30 l'indice ($C_{EEP} - 1$) qui précède le basculement dès que la valeur constante E_0 est égale ou est très proche de 1.

C'est la raison pour laquelle on choisira un pas de recherche correspondant à une fraction d'indice, par exemple 10% d'un cycle n .

- 5 Dans le premier mode de réalisation précité, on prévoit une pluralité d'échantillons standard d'effectifs initiaux respectifs connus, auxquels on applique la succession d'amplifications, sensiblement dans les mêmes conditions que pour l'échantillon d'intérêt. On détermine aussi leurs
- 10 indices respectifs de basculement selon les étapes a), b) et c) décrites précédemment. A l'étape d) :
- on établit une dépendance entre les effectifs initiaux des échantillons standard N_0^{st} et leurs indices C_{EEP}^{st} ,
 - et, après la détermination de l'indice pour
- 15 l'échantillon d'intérêt C_{EEP} , on détermine l'effectif initial de la population d'intérêt N_0 par interpolation sur cette dépendance.

Ainsi, en se référant à la figure 5, on peut établir une

20 dépendance entre le cycle de basculement C_{EEP}^1, C_{EEP}^2 des standards et leur concentration initiale N_0^1, N_0^2 (en fait leur logarithme), par exemple par régression. En mesurant l'indice de basculement C_{EEP}^{int} pour l'échantillon d'intérêt et en reportant sa valeur sur la pente de régression de la

25 figure 5, on obtient par interpolation la concentration initiale N_0^{int} dans l'échantillon d'intérêt.

Ce premier mode de réalisation s'apparente donc sensiblement à celui de l'art antérieur décrit en

30 référence à la figure 3. Cependant, on gardera à l'esprit que l'indice de basculement C_{EEP} sur lequel se base ce

premier mode de réalisation ne correspond aucunement au cycle Ct de l'art antérieur.

Dans une approche sensiblement différente de ce premier mode de réalisation :

- à l'étape b), on exprime en fait, en utilisant le modèle de rendement, une variation paramétrée en fonction de la succession d'amplifications, cette variation mettant en jeu au moins un paramètre représentant l'indice de basculement C_{EEP} , et
- à l'étape c), par comparaison avec les mesures expérimentales, on détermine au moins ce paramètre représentant l'indice de basculement C_{EEP} .

Dans un second mode de réalisation, cette variation paramétrée est représentative de l'effectif courant N_n dans l'échantillon d'intérêt.

Typiquement, cette variation paramétrée peut être tirée de l'expression du type donné ci-avant :

$$N_{n+1} = N_0 \times (1 + E_0)^{C_{EEP}} \times \text{fonction}(C_{EEP}, n+1)$$

Ainsi, cette variation met en jeu, outre un paramètre représentant l'indice de basculement C_{EEP} , un paramètre représentatif de l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt N_0 .

Ensuite, aux étapes c) et d) de ce second mode de réalisation, on détermine sensiblement conjointement ces deux paramètres C_{EEP} et N_0 .

Auparavant, à l'étape a), il faut déterminer un modèle pour la fonction précitée $\text{fonction}(C_{EEP}, n+1)$.

Le plus souvent, pour une quantification par PCR, on choisira un modèle pour la phase non constante du rendement correspondant à une exponentielle décroissante comportant un paramètre de décroissance β qui sera plus détaillé ci-après. Ce paramètre de décroissance β est alors déterminé, à l'étape c), au moins avec l'indice de basculement C_{EEP} , par comparaison avec les mesures expérimentales.

Ainsi, dans ce second mode de réalisation, une fois le modèle du rendement E_n choisi, on l'applique à l'expression générale de l'effectif courant N_n donnée par la relation ci-avant. On obtient alors un modèle de la variation de l'effectif courant N_n .

Toutefois, à moins que les mesures expérimentales ne donnent directement la valeur de l'effectif courant N_n (ce qui est rarement le cas en pratique, actuellement), il convient de modéliser ensuite les mesures expérimentales E_n , elles-mêmes, en gardant à l'esprit la soustraction du bruit de fond et la compensation consécutive ε décrites ci-avant.

Ainsi, dans une réalisation actuellement préférée, la variation paramétrée précitée :

- est représentative des mesures expérimentales, et
- comporte un paramètre correspondant à une valeur de mesure F_0 représentative de l'effectif initial.

On détermine ensuite la valeur de mesure de l'effectif initial F_0 par comparaison de cette variation paramétrée F_n avec les mesures expérimentales.

5 En fait, pour mener cette comparaison, on pourra par exemple ajuster les paramètres F_0 , E_0 , C_{EEP} et le paramètre de décroissance β dans le modèle des mesures F_n par corrélations statistiques (typiquement la méthode des moindres carrés) qui s'appuient sur les mesures
10 expérimentales brutes. Un exemple de réalisation est détaillé ci-après.

On obtient d'abord une variation de la quantité de fluorescence mesurée et ajustée, en fonction du nombre de
15 cycles de PCR appliqués, telle que représentée par exemple sur la figure 6A. Cette figure montre la courbe d'amplification d'un échantillon d'intérêt contenant des acides nucléiques, ici un fragment d'ADN de quantité initiale de 100000 copies, marqué par l'intercalant
20 SYBRGREEN lors de la réaction de PCR que l'on effectue sur l'appareil I-Cycler IQ® de la société BIO-RAD®.

Dans l'exemple décrit, on comprendra que la réaction d'amplification est une réaction de PCR en temps réel. Les
25 mesures expérimentales représentent des quantités de fluorescence émises.

On note ci-après F_n la fluorescence au cycle n préalablement ajustée pour le bruit de fond, comme indiqué
30 ci-avant. On note aussi F_0 la fluorescence initiale théorique avant le premier cycle. On note E_n l'efficacité

de la PCR au cycle n . On désigne par N le nombre total de cycles effectués durant la réaction de PCR.

Par hypothèse, la fluorescence mesurée à chaque cycle n de la réaction de PCR est définie par :

$$F_{n+1} \approx F_n(1+E_n) \quad \text{pour tout } n \in \{0,1,2,\dots,N-1\} \quad (1)$$

avec $0 \leq E_n \leq 1$.

On calcule l'efficacité de la réaction à chaque cycle n , comme suit :

$$E_n = \frac{N_{n+1}}{N_n} - 1 \approx \frac{F_{n+1}}{F_n} - 1 \quad \text{pour tout } n \in \{1,2,\dots,N-1\} \quad (2)$$

On remarquera que l'équation (1) est supposée vraie pour $n=0$. Toutefois, par définition, la fluorescence initiale F_0 est inconnue. L'efficacité au premier cycle E_0 ne peut donc pas être calculée directement par la formule (2).

On a représenté sur la figure 6B l'efficacité de la réaction PCR approximée par la formule (2) et à partir de la variation de la fluorescence ajustée de la figure 6A, en fonction du nombre de cycles n .

On formule préférentiellement les hypothèses suivantes :

- l'efficacité de la réaction est relativement constante durant les premiers cycles, et
- à partir d'un certain nombre de cycles effectués, l'efficacité de la réaction décroît.

La figure 6B vient conforter la seconde hypothèse, puisque l'on peut constater la décroissance de l'efficacité à

partir du cycle $n=17$. En revanche, les efficacités des cycles 1 à 16 sont fortement bruitées ce qui rend difficile la vérification graphique de la première hypothèse.

5

Toutefois, on affecte préférentiellement à la variation de l'efficacité un modèle du type incluant :

- une première phase, constante, entre le premier cycle de PCR et le cycle $(C_{EEP}-1)$ qui précède le cycle de basculement noté C_{EEP} , et
- une seconde phase, décroissante, pour les cycles supérieurs ou égaux au cycle $(C_{EEP}-1)$.

10

Le cycle $(C_{EEP}-1)$ représente donc le dernier cycle, qui peut être fractionnaire, auquel l'efficacité est encore constante.

15

On propose alors de modéliser l'efficacité de la réaction de la façon suivante :

$$E_n = \begin{cases} E_0 & \text{pour } 0 \leq n \leq (C_{EEP}-1) \\ (1+E_0)^{\exp(-\beta(n-C_{EEP}+1))} - 1 & \text{pour } (C_{EEP}-1) \leq n \leq (N-1) \end{cases} \quad (3)$$

20

où E_0 et β sont des paramètres réels qui sont estimés grâce à la courbe d'amplification de la figure 6A, ou encore grâce à la courbe d'efficacité de la figure 6B, comme on le verra ci-après.

25

En variante, on indique qu'un autre choix, par exemple parmi les modèles ci-après F1 à F3, peut être préféré, notamment en fonction du type d'acide nucléique que l'on souhaite quantifier :

$$F1: E_n = \exp(-\beta(n-C_{EEP}+1)) - 1$$

$$F2: E_n = \exp(-\mu(n-C_{EEP}+1)^\alpha) - 1$$

$$F3: E_n = \alpha - \exp(-\mu(n-C_{EEP}+1)^\alpha) - 1$$

On estime préférentiellement plusieurs jeux de paramètres à l'étape c) pour plusieurs candidats de cycle de basculement C_{EEP} , et l'on choisit le cycle candidat minimal dont les paramètres associés maximisent les corrélations statistiques qui peuvent être menées à l'étape c), en tant que cycle de basculement C_{EEP} .

Comme on l'a vu précédemment, l'expression (1) ci-avant peut encore s'écrire sous la forme :

$$F_n = F_0 \prod_{k=0}^{n-1} (1+E_k) \quad \text{pour } n \in \{1,2,\dots,N\} \quad (4)$$

Ainsi, en introduisant l'expression de l'efficacité (3) dans la formule (4), on obtient un nouveau modèle à quatre paramètres (F_0 , E_0 , β , C_{EEP}) pour la fluorescence émise ajustée F_n :

$$F_n = \begin{cases} F_0(1+E_0)^n & \text{pour } 1 \leq n \leq C_{EEP} \\ F_0(1+E_0)^{C_{EEP}} + \frac{1 - \exp(-\beta(n-C_{EEP}))}{\exp(\beta) - 1} & \text{pour } C_{EEP} \leq n \leq N \end{cases} \quad (5)$$

L'effectif initial dans la population d'intérêt N_0 , l'efficacité E_0 de la réaction à $n=0$, le paramètre β et le cycle de basculement C_{EEP} , sont évalués répétitivement pour plusieurs valeurs de cycles dans la région de basculement BAS, pour trouver un maximum de corrélations statistiques atteint pour une valeur de cycle minimale égale au cycle de basculement C_{EEP} .

Dans ce second mode de réalisation, on préfère modéliser la variation des quantités de fluorescence mesurées et ajustées, en fonction des cycles, en se basant sur la modélisation de la variation de l'efficacité, et mener ensuite les corrélations directement sur les quantités de fluorescence mesurées et ajustées.

On remarquera qu'en ajustant les mesures de fluorescence émises pour le bruit de fond, on crée aussi, de façon factice, un ajustement de la fluorescence initiale F_0 . Ainsi, estimer les paramètres du modèle d'efficacité à partir de mesures d'efficacité qui sont déduites des mesures de fluorescence ajustées, est une source d'erreurs supplémentaires et il peut être préféré de procéder en deux étapes, comme on le verra dans le troisième mode de réalisation qui sera décrit plus loin.

Toutefois, le second mode de réalisation proposé est plus simple et s'adapte bien aux quantifications par PCR utilisant des mesures de fluorescence. Il se base sur les mesures réelles de fluorescence F'_n , qui correspondent aux mesures de fluorescence ajustées pour la dérive du bruit de fond avec une compensation ε menée sur ces mesures. Le bruit de fond ayant été soustrait, on retrouve une relation du type :

$$F'_n = F_n + \varepsilon.$$

où ε est une quantité qui peut dépendre ou non du cycle n . Elle est choisie ici constante, préférentiellement.

Dans ce cas, l'efficacité mesurée et "ajustée" aussi, notée E'_n au cycle n est définie par :

$$E'_n = \frac{F'_{n+1}}{F'_n} - 1 = \frac{F_{n+1} + \varepsilon}{F_n + \varepsilon} - 1 \quad \text{pour tout } n \in \{1, 2, \dots, N-1\} \quad (7)$$

5 Le modèle de la relation (5) ci-avant devient :

$$F_n = \begin{cases} F'_0 (1+E'_0)^n - \varepsilon & \text{pour } 1 \leq n \leq C_{EEP} \\ F'_0 (1+E'_0)^{C_{EEP} + \frac{1 - \exp(-\beta'(n-C_{EEP}))}{\exp(\beta') - 1}} - \varepsilon & \text{pour } C_{EEP} \leq n \leq N \end{cases} \quad (8)$$

10 Dans ce cas, les valeurs d'efficacité E'_n sont approximées expérimentalement à partir des mesures, de façon à pouvoir fixer un seuil d'efficacité minimal toléré dans la phase d'efficacité décroissante. On détermine ainsi un cycle seuil au-delà duquel les mesures de fluorescence ajustées (points NEG figure 4B) ne seront pas exploitées pour mener la modélisation. Typiquement, le cycle seuil correspond au
15 premier cycle de la phase d'efficacité décroissante pour lequel l'efficacité est inférieure au seuil d'efficacité minimal toléré (par exemple $0,1.E_0$).

20 Plus généralement, la valeur du seuil d'efficacité peut préférentiellement être comprise entre 0 et 0,5, et une efficacité de PCR inférieure à cette valeur est potentiellement biaisée par des phénomènes d'inhibition incontrôlés.

25 Dans l'exemple représenté sur la figure 7, la valeur seuil d'efficacité a été fixée à 0,02 (soit 2% de E_0). Le cycle seuil C_s correspondrait au cycle $n=36$. On a représenté sur cette figure 7 les mesures de fluorescence émises

ajustées. On constate une corrélation satisfaisante du modèle (trait plein) avec les mesures expérimentales (marquées "o") jusqu'au cycle $n=36$. La figure 8 montre aussi une bonne corrélation avec les mesures expérimentales des prédictions de l'efficacité, obtenue à partir de la figure 7 et de la modélisation de la fluorescence mesurée et ajustée.

Les étapes principales de ce mode de réalisation peuvent se résumer comme suit, en référence à la figure 9.

A l'étape de début 70, on a obtenu les valeurs de quantités de fluorescence mesurées et ajustées par rapport au bruit de fond en fonction du nombre de cycles n , comme représenté sur la figure 6A.

A l'étape 71, on calcule une approximation de l'efficacité de la réaction au cycle n grâce à la formule (2) ci-avant, pour tout cycle $n = 1, 2, \dots, (N-1)$.

A l'étape 72, on détermine le cycle C_s minimal de façon à ce que les deux conditions suivantes sont satisfaites :

- le cycle C_s se situe dans la phase d'efficacité décroissante,
- l'efficacité au cycle seuil est inférieure à la valeur seuil d'efficacité E_s (par exemple $E_s = 0,1.E_0$) :

$$E_{C_s} \leq E_s$$

On peut déjà éliminer les points NEG pour lesquels l'efficacité est inférieure à E_s .

A l'étape 73, on modélise la courbe de fluorescence émise ajustée dans la décroissance de l'efficacité, sur la portion de cycles $C_{EEP} = (C_s - 5)$ à C_s , grâce à l'expression (8) dans laquelle on a fait l'hypothèse sur la compensation ε telle que $\varepsilon = F'_0$:

$$F_n = F'_0 (1 + E'_0)^{C_{EEP} + \frac{1 - \exp(-\beta(n - C_{EEP}))}{\exp(\beta) - 1}} - F'_0$$

Ensuite, le test 74 sur la valeur estimée \hat{E}'_0 de E'_0 et la décrémentation à l'étape 75 de la valeur du cycle de basculement C_{EEP} visent à diminuer la valeur recherchée de C_{EEP} d'un pas P (qui peut être égal à 1) et à répéter l'étape 73 tant que la valeur de \hat{E}'_0 est inférieure à 1.

Ensuite, lorsque la valeur d'efficacité estimée dépasse la valeur 1 (flèche n en sortie du test 74), on incrémente la valeur de l'indice C_{EEP} d'un pas h (qui peut être une fraction d'unité) à l'étape 76 et on procède à une étape 77 de modélisation de la fluorescence F_n du type de celle menée à l'étape 73. Tant que l'efficacité estimée \hat{E}'_0 est supérieure ou égale à 1 au test 78, on répète les étapes 76 à 78. Lorsque l'efficacité estimée prend une valeur inférieure à 1, on conserve les paramètres estimés $(\hat{F}'_0, \hat{E}'_0, \hat{\beta}, \hat{C}_{EEP})$ à l'étape de fin 79.

A cette étape, on a obtenu finalement une valeur \hat{F}'_0 seulement représentative de l'effectif initial N_0 dans l'échantillon d'intérêt. On peut alors avoir recours à au moins un échantillon standard d'effectif initial N_0^{st}

connu, pour déterminer, à l'étape 80, l'effectif initial N_0 dans l'échantillon d'intérêt.

A cet effet, on obtient une valeur de mesure d'un effectif initial F_{0st} dans un échantillon standard d'effectif initial connu N_{0st} . On détermine ensuite la valeur de l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt N_0 par application d'une même relation de proportionnalité entre l'effectif initial N_0 et sa mesure F'_0 , dans l'échantillon standard d'une part, et dans l'échantillon d'intérêt d'autre part.

En d'autres termes, à l'étape 80 de la figure 9, on peut déterminer la valeur N_0 de l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt par une simple règle de trois du type : $N_0 = \hat{F}'_0 (N_{0st} / \hat{F}'_{0st})$, impliquant l'effectif initial dans le standard N_{0st} et un rapport des fluorescences corrigées, compensées et estimées par ajustement du modèle de fluorescence, pour l'échantillon d'intérêt et pour l'échantillon standard.

On comprendra ainsi qu'un seul standard devrait être suffisant pour déterminer l'effectif initial de la population d'intérêt dans l'échantillon d'intérêt, selon un avantage que procure l'invention.

Néanmoins, dans une variante qui peut aussi être prévue si nécessaire, on obtient les valeurs respectives de mesures d'effectifs initiaux \hat{F}'_{0st} dans plusieurs échantillons standard d'effectifs initiaux connus N_{0st} . On établit

ensuite une dépendance entre les effectifs initiaux N_{0st}
 des échantillons standard et leurs valeurs respectives de
 mesure d'effectif initial \hat{F}'_{0st} . Ensuite, après la
 détermination de la valeur de mesure de l'effectif initial
 5 pour l'échantillon d'intérêt \hat{F}'_0 , on détermine l'effectif
 initial de la population d'intérêt N_0 par interpolation
 sur cette dépendance. On comprendra que cette dépendance
 peut être encore typiquement une régression du type
 représenté sur la figure 5, mais sur laquelle on reportera
 10 en ordonnées les fluorescences initiales \hat{F}'_{0st} des standards
 et de l'échantillon d'intérêt \hat{F}'_0 (ou leurs valeurs
 logarithmes respectives), plutôt que leur valeur d'indice
 de basculement C_{EEP} .

15 Dès lors que l'on fait appel à un ou plusieurs standards,
 on peut prévoir un ou plusieurs échantillons standard
 d'effectifs initiaux respectifs connus N_{0st} , auxquels on
 applique la succession de réactions d'amplifications,
 sensiblement dans les mêmes conditions que pour
 20 l'échantillon d'intérêt. Ensuite, la détermination de leur
 valeur de mesure d'effectif initial \hat{F}'_{0st} se fait par
 comparaison des variations paramétrées avec les mesures
 expérimentales, comme pour l'échantillon d'intérêt.

25 En d'autres termes, on applique bien entendu les mêmes
 calculs pour les quantités de fluorescence mesurées et
 ajustées sur le ou les standard(s) et pour l'échantillon
 d'intérêt. On estime la quantité de fluorescence \hat{F}'_{0st} avant
 le premier cycle, pour le ou les standard(s) selon le même

procédé de détermination de \hat{F}_0 pour l'échantillon d'intérêt, décrit ci-avant.

Un troisième mode de réalisation, correspondant à une variante du second mode de réalisation ci-avant consiste globalement à ajuster le modèle de l'efficacité E_n par rapport aux mesures expérimentales et à injecter ensuite ce modèle d'efficacité ajusté dans le modèle de l'effectif courant N_n ou encore dans le modèle des mesures F_n . Ce troisième mode de réalisation se résume comme suit.

La variation paramétrée construite à l'étape b) est représentative du rendement, et, à l'étape c), on détermine une variation expérimentale du rendement à partir des mesures expérimentales, pour comparer la variation paramétrée à la variation expérimentale. Ensuite, pour accéder à un paramètre représentatif de l'effectif initial N_0 , à l'étape d) :

- d1) on détermine une seconde variation paramétrée, représentative de l'effectif courant N_n dans l'échantillon d'intérêt, et mettant en jeu au moins le paramètre représentant l'indice de basculement C_{EEP} , ainsi qu'un paramètre représentatif de l'effectif initial N_0 ,
- d2) on applique à cette seconde variation une valeur du paramètre de l'indice de basculement C_{EEP} déterminé à l'étape c),
- d3) et on ajuste au moins le paramètre représentatif de l'effectif initial N_0 par comparaison directe de la seconde variation avec les mesures expérimentales.

On peut avantageusement :

- à l'étape d2), appliquer une valeur grossière de l'indice de basculement C_{EEP} , comme on a décrit sa détection en référence à la figure 4B ci-avant, tandis que
- à l'étape d3), on peut affiner ensuite la valeur de l'indice conjointement avec l'ajustement du paramètre représentatif de l'effectif initial N_0 .

10 Finalement, on retiendra simplement que le second mode de réalisation des figures 7 et 8, actuellement préféré, se distingue de ce troisième mode de réalisation par le fait que l'on ne cherche pas à mener les corrélations sur l'efficacité, mais on utilise simplement le modèle

15 mathématique de variation de l'efficacité pour modéliser et affiner l'estimation de la fluorescence corrigée et compensée.

Bien entendu, la présente invention ne se limite pas à la

20 forme de réalisation décrite ci-avant à titre d'exemple ; elle s'étend à d'autres variantes.

Ainsi, on comprendra que la présente invention peut s'appliquer en outre à la quantification relative,

25 notamment par PCR. Dans cette application, on prévoit d'amplifier, outre la population d'intérêt, une population de référence soit conjointement dans le même support, soit séparément. On relève respectivement :

- les mesures expérimentales représentatives de
- 30 l'effectif de la population d'intérêt, et

- les mesures expérimentales représentatives de l'effectif de la population de référence.

Le procédé peut se poursuivre alors par l'application, à la population de référence, des étapes a), b) et c), tandis que l'étape d) consiste simplement à déterminer un ratio entre les effectifs initiaux respectifs de la population d'intérêt et de la population de référence.

On indique que la quantification relative peut être utilisée pour analyser l'expression d'un gène d'intérêt au cours du développement d'un organisme. Pour corriger notamment les variations de quantité et de qualité entre les échantillons prélevés sur l'organisme à différents instants, on analyse, en plus du gène cible d'intérêt, un gène de référence connu pour avoir un niveau d'expression stable au cours du développement.

Il s'agira finalement de comparer les ratios $\frac{N_{\text{cible}}}{N_{\text{réf}}}$ entre les différents échantillons prélevés.

20

Pour aboutir aux résultats souhaités, deux stratégies sont possibles.

Celle de l'art antérieur basée sur la détection du cycle Ct se déroule habituellement comme suit. On détermine, pour chaque échantillon prélevé à différents instants t_0 , t_1 , t_2 , ..., t_n , le ratio $\frac{N_{\text{cible}}}{N_{\text{réf}}}$, en utilisant au moins un standard (c'est-à-dire un échantillon dont N_{cible} et $N_{\text{réf}}$

sont connus), ce qui revient à faire deux quantifications absolues successives suivies d'un calcul de ratio.

5 Une autre stratégie particulièrement avantageuse dans le contexte de l'invention consiste à déterminer, pour chaque échantillon prélevé à différents instants $t_0, t_1, t_2, \dots, t_n$

directement le ratio $\frac{\left(\frac{\bar{N}_{0cible}}{N_{0ref}}\right)_{éch}}{\left(\frac{N_{0cible}}{N_{0ref}}\right)_{éch_t0}}$ grâce à la formule :

$$\frac{\left(\frac{N_{0cible}}{N_{0ref}}\right)_{éch}}{\left(\frac{N_{0cible}}{N_{0ref}}\right)_{éch_t0}} = \frac{\frac{(F_{0cible})_{éch}}{(F_{0cible})_{éch_t0}}}{\frac{(F_{0ref})_{éch}}{(F_{0ref})_{éch_t0}}}$$

10 Dans cette seconde réalisation qui n'utilise finalement que le paramètre F_0 , en combinant la technique de l'invention, aucun échantillon standard n'est nécessaire, de façon particulièrement avantageuse.

15 On se réfère maintenant à la figure 10 sur laquelle on a représenté une installation pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention. Elle comporte un support SUPP comportant ici un puits comprenant l'échantillon d'intérêt ECH et un puits comprenant par exemple un échantillon
20 standard noté St. Le support SUPP est enfermé dans une enceinte ENC par exemple équipée de moyens de chauffage (non représentés) pour appliquer au standard et à l'échantillon d'intérêt une réaction de PCR.

Dans l'exemple décrit, on prévoit préférentiellement d'appliquer des mesures de quantités de fluorescence émises à chaque cycle par le standard St et par l'échantillon d'intérêt ECH. A cet effet, on introduit
5 dans les puits un réactif choisi et on éclaire les échantillons à partir d'une lampe (par exemple halogène-tungstène) dans le but de mesurer des quantités respectives de fluorescence émanant de l'échantillon d'intérêt et de l'échantillon standard, à chaque cycle de
10 PCR qui sera appliqué. En outre, un appareil de détection de fluorescence comporte par exemple un objectif 11 pour collecter la lumière issue de la fluorescence, ainsi que des moyens de comptage de photons 10, par exemple une caméra CCD, et/ou des photomultiplicateurs, pour compter
15 la fluorescence émise à chaque cycle de PCR, par l'échantillon d'intérêt et le standard. Ainsi, la fluorescence émise par chaque puits est avantageusement focalisée par l'objectif 11, puis détectée préférentiellement par une caméra CCD 10 connectée à une
20 carte d'acquisition 21, par exemple de type PCMCIA prévue dans une unité centrale 20 d'un ordinateur.

Cet ordinateur est alors relié aux moyens de comptage 10 précités pour recevoir des signaux représentatifs de
25 mesures de quantité de fluorescence détectée à chaque cycle de PCR et traiter ces signaux pour déterminer un effectif initial de la population d'intérêt avant le premier cycle, par la mise en œuvre du procédé au sens de l'invention.

30

On indique que l'unité de traitement comporte typiquement :

- une carte d'acquisition 21 connectée aux moyens de comptage 10,
- 5 - une mémoire de travail 25 (par exemple de type RAM) pour le stockage temporaire et le traitement des signaux précités,
- une mémoire permanente 24 pour le stockage du produit programme d'ordinateur au sens de l'invention et des données traitées et prêtes à exploitation, par exemple
- 10 pour un diagnostic ultérieur,
- le cas échéant, un lecteur 22 d'un support mémoire tel qu'un CD-ROM, ou autre, sur lequel peut être stocké initialement le produit programme d'ordinateur,
- 15 - éventuellement, une interface de communication 26 vers un site local ou distant (liaison 28), par exemple pour la transmission des données traitées pour un diagnostic sur le patient réalisé à distance,
- une interface graphique 27 reliée typiquement à un
- 20 moniteur d'affichage 30,
- et un processeur 23 pour gérer les interactions entre ces différents équipements.

On indique que l'ordinateur peut comporter aussi des

25 organes de saisie tels qu'un clavier 41 et/ou une souris 42 reliés à l'unité centrale 20.

On retiendra toutefois que l'installation au sens de l'invention comporte globalement :

- 30 - un support SUPP d'échantillon au moins pour l'échantillon d'intérêt,

- un premier appareil ENC pour appliquer, au moins à la population d'intérêt dans l'échantillon d'intérêt, ladite succession de réactions d'amplification,
- un second appareil 10 pour relever des mesures représentatives de l'effectif courant de la population d'intérêt, et
- des moyens informatiques 20 propres à récupérer des signaux de mesures du second appareil 10 et à mettre en œuvre tout ou partie des étapes du procédé au sens de l'invention.

A cet effet, un produit programme d'ordinateur peut animer ces moyens informatiques. Ce programme peut être stocké dans une mémoire de l'unité de traitement 20, ou sur un support mémoire amovible (CD-ROM ou autre) et destiné à coopérer avec le lecteur de l'unité de traitement. Le programme d'ordinateur au sens de l'invention comporte alors des instructions pour la mise en œuvre de tout ou partie des étapes du procédé selon l'invention. Par exemple, l'algorithme de ce programme peut être représenté par un organigramme équivalent au schéma de la figure 9.

Revendications

1. Procédé mis en œuvre par des moyens informatiques pour quantifier, de façon absolue et/ou relative, une population initiale d'acides nucléiques dans un échantillon d'intérêt soumis à une succession d'applications d'une réaction d'amplification de la population, au cours desquelles on relève des mesures expérimentales représentatives d'un effectif courant de la population au moins dans l'échantillon d'intérêt,
- caractérisé en ce qu'il comporte les étapes :
- a) prévoir un modèle de rendement (E_n) de la réaction d'amplification en fonction de la succession d'amplifications, ce modèle comportant :
- o une phase sensiblement constante (E_0) pour une première partie des applications de la réaction, et
 - o une phase non constante pour une seconde partie des applications de la réaction,
- les première et seconde parties étant séparées par une région de basculement du rendement entre les phases constante et non constante, incluant un indice d'application (C_{EEP}) correspondant sensiblement au basculement,
- b) exprimer, en utilisant le modèle de rendement, une relation faisant intervenir au moins l'indice de basculement et un paramètre représentant l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt ($N_0; F_0$),
- c) par comparaison avec les mesures expérimentales, déterminer au moins l'indice de basculement, et, dans

une étape d) ultérieure ou conjointe, en déduire l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt (N_0).

5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que :

- à l'étape b), on exprime, en utilisant le modèle de rendement, une variation paramétrée en fonction de ladite succession d'amplifications, mettant en jeu au moins un paramètre représentant l'indice de basculement (C_{EEP}), et
- 10 - à l'étape c), par comparaison avec lesdites mesures expérimentales, on détermine au moins ce paramètre représentant l'indice de basculement (C_{EEP}).

15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite variation paramétrée est représentative de l'effectif courant (N_n) dans l'échantillon d'intérêt, en ce que ladite variation met en jeu en outre un paramètre représentatif de l'effectif initial dans

20 l'échantillon d'intérêt (N_0), et en ce que, aux étapes c) et d), on détermine sensiblement conjointement les paramètres représentatifs dudit indice d'application (C_{EEP}) et de l'effectif initial (N_0) dans l'échantillon d'intérêt.

25 4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite variation paramétrée est représentative du rendement, et en ce que, à l'étape c), on détermine une variation expérimentale du rendement à partir desdites

30 mesures expérimentales, pour comparer la variation paramétrée à la variation expérimentale.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que, à l'étape d) :

- 5 d1) on détermine une seconde variation paramétrée, représentative de l'effectif courant (N_n) dans l'échantillon d'intérêt, et mettant en jeu au moins le paramètre représentant ledit indice d'application (C_{EEP}), ainsi qu'un paramètre représentatif de l'effectif initial (N_0) dans l'échantillon d'intérêt,
- 10 d2) on applique à la seconde variation une valeur du paramètre de l'indice (C_{EEP}) déterminé à l'étape c),
- d3) et on ajuste au moins le paramètre représentatif de l'effectif initial (N_0) par comparaison directe de la seconde variation avec les mesures expérimentales.

15

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que :

- à l'étape d2), on applique une valeur grossière de l'indice (C_{EEP}), tandis que
- 20 - à l'étape d3), on affine la valeur de l'indice conjointement avec l'ajustement du paramètre représentatif de l'effectif initial (N_0).

25 7. Procédé selon la revendication 3 ou la revendication 6, caractérisé en ce que ladite variation paramétrée ou, respectivement, ladite seconde variation paramétrée :

- est représentative desdites mesures expérimentales, et
- comporte un paramètre correspondant à une valeur de mesure (F_0) représentative de l'effectif initial,
- 30 et en ce que l'on détermine la valeur de mesure de l'effectif initial (F_0) par comparaison desdites

variations paramétrées (F_n) avec les mesures expérimentales.

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on applique une étape préalable de traitement des mesures expérimentales comprenant une soustraction d'un bruit de fond de mesures et d'introduction d'une compensation pour tenir compte d'une mesure non nulle (ε) représentative de l'effectif initial.

9. Procédé selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisé en ce qu'on obtient une valeur de mesure d'un effectif initial (F_0^{st}) dans un échantillon standard d'effectif initial connu (N_0^{st}),

et en ce qu'on détermine la valeur de l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt (N_0) par application d'une même relation de proportionnalité entre l'effectif initial et sa mesure, dans l'échantillon standard d'une part, et dans l'échantillon d'intérêt d'autre part.

10. Procédé selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisé en ce qu'on obtient des valeurs respectives de mesures d'effectifs initiaux (F_0^{st}) dans des échantillons standards d'effectifs initiaux connus (N_0^{st}),

et en ce que :

- on établit une dépendance entre les effectifs initiaux (N_0^{st}) des échantillons standard et leurs valeurs respectives de mesure d'effectif initial (F_0^{st}),
- et, après la détermination de la valeur de mesure de l'effectif initial pour l'échantillon d'intérêt (F_0), on

détermine l'effectif initial de la population d'intérêt (N_0) par interpolation sur ladite dépendance.

11. Procédé selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que l'on prévoit un ou une pluralité d'échantillons standard d'effectifs initiaux respectifs connus - (N_0^{st}), auxquels on applique ladite succession d'amplifications, sensiblement dans les mêmes conditions que pour l'échantillon d'intérêt, ainsi que la détermination de leur valeur de mesure d'effectif initial (F_0^{st}) par comparaison des variations paramétrées (F_n^{st}) avec les mesures expérimentales.

12. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'on prévoit une pluralité d'échantillons standard d'effectifs initiaux respectifs connus, auxquels on applique ladite succession d'amplifications, sensiblement dans les mêmes conditions que pour l'échantillon d'intérêt, ainsi que la détermination de leurs indices respectifs selon les étapes a), b) et c), et en ce que, à l'étape d) :

- on établit une dépendance entre les effectifs initiaux des échantillons standard (N_0^{st}) et leurs indices (C_{EEP}^{st}),
- et, après la détermination de l'indice pour l'échantillon d'intérêt (C_{EEP}), on détermine l'effectif initial de la population d'intérêt (N_0) par interpolation sur ladite dépendance.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que, pour une quantification relative,

on prévoit, outre la population d'intérêt, une population de référence soumise à une succession d'applications de réaction d'amplification, et on relève respectivement :

- les mesures expérimentales représentatives de l'effectif de la population d'intérêt, et
 - les mesures expérimentales représentatives de l'effectif de la population de référence,
- le procédé se poursuivant par l'application, à la population de référence, des étapes a), b) et c), tandis que l'étape d) consiste à déterminer un ratio entre les effectifs initiaux respectifs de la population d'intérêt et de la population de référence.

14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que :

- on exprime les mesures expérimentales sous la forme d'une variation expérimentale du rendement en fonction de ladite succession d'applications,
- on obtient une variation expérimentale du rendement en fonction de ladite succession d'applications, comportant :
 - * une première région sensiblement bruitée pour des indices d'applications faibles,
 - * suivie d'une seconde région moins bruitée pour des indices d'applications plus élevés.

15. Procédé selon la revendication 14, dans lequel ladite phase non constante du rendement est décroissante, caractérisé en ce que :

- on estime une valeur grossière de phase constante du rendement (E_0), et

- au moins pour la recherche de l'indice (C_{EEP}) dans ladite région de basculement, on ignore une partie au moins des mesures dans ladite seconde région moins bruitée et dont le rendement estimé est inférieur à une valeur seuil, de préférence à une fraction de la phase constante (E_0).

16. Procédé selon l'une des revendications 14 et 15, dans lequel ladite phase non constante du rendement est décroissante, caractérisé en ce que l'on repère ladite région de basculement, dans le sens des indices d'applications décroissants à partir de ladite seconde région moins bruitée, en détectant un indice grossier d'application d'amplification dont le rendement dépasse sensiblement une valeur prédéterminée ($E_0=1$).

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on affine l'estimation de la valeur, le cas échéant fractionnaire, dudit indice d'application (C_{EEP}) dans la région de basculement, dans le sens des indices d'applications croissants à partir de l'indice grossier, en détectant un indice d'application d'amplification dont le rendement vaut environ ladite valeur prédéterminée ($E_0=1$).

18. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite phase non constante du rendement est modélisée par une exponentielle décroissante comportant un paramètre de décroissance (β), et en ce que ledit paramètre de décroissance (β) est déterminé, à

l'étape c) avec l'indice dans la région de basculement (CEEP), par comparaison avec les mesures expérimentales.

19. Procédé selon l'une des revendications précédentes,
5 dans lequel la réaction d'amplification est une réaction de PCR ("*Polymerase Chain Reaction*") en temps réel.

20. Procédé selon l'une des revendications précédentes,
10 dans lequel lesdites mesures sont des quantités de fluorescence émises.

21. Installation pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comporte :

- 15 - un support d'échantillon au moins pour l'échantillon d'intérêt,
- un premier appareil pour appliquer, au moins à la population d'intérêt dans l'échantillon d'intérêt, ladite succession de réactions d'amplification,
- 20 - un second appareil pour relever des mesures représentatives de l'effectif courant de la population d'intérêt, et
- des moyens informatiques propres à récupérer des signaux de mesures du second appareil et à mettre en
- 25 œuvre tout ou partie des étapes du procédé selon l'une des revendications précédentes.

22. Produit programme d'ordinateur, destiné à être stocké dans une mémoire d'une unité de traitement, ou sur un
30 support mémoire amovible et destiné à coopérer avec un lecteur de ladite unité de traitement, caractérisé en ce

qu'il comporte des instructions pour la mise en œuvre de tout ou partie des étapes du procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

ABRÉGÉ

Procédé, installation et programme d'ordinateur pour estimer l'effectif initial d'une population d'acides nucléiques, notamment par PCR

Pour estimer une population initiale d'acides nucléiques dans un échantillon d'intérêt, notamment par PCR :

- a) on prévoit un modèle d'efficacité (E_n) de PCR comportant une phase constante (E_0) suivie d'une phase non constante, séparées par une région de basculement incluant un indice de basculement (C_{EEP}),
- b) on exprime, en utilisant le modèle d'efficacité, une relation entre l'indice de basculement et un paramètre représentant l'effectif initial,
- c) par comparaison avec les mesures expérimentales, on détermine l'indice de basculement, et on en déduit l'effectif initial dans l'échantillon d'intérêt.

(FIGURE 4B)

1/5

FIG. 1 (art antérieur)

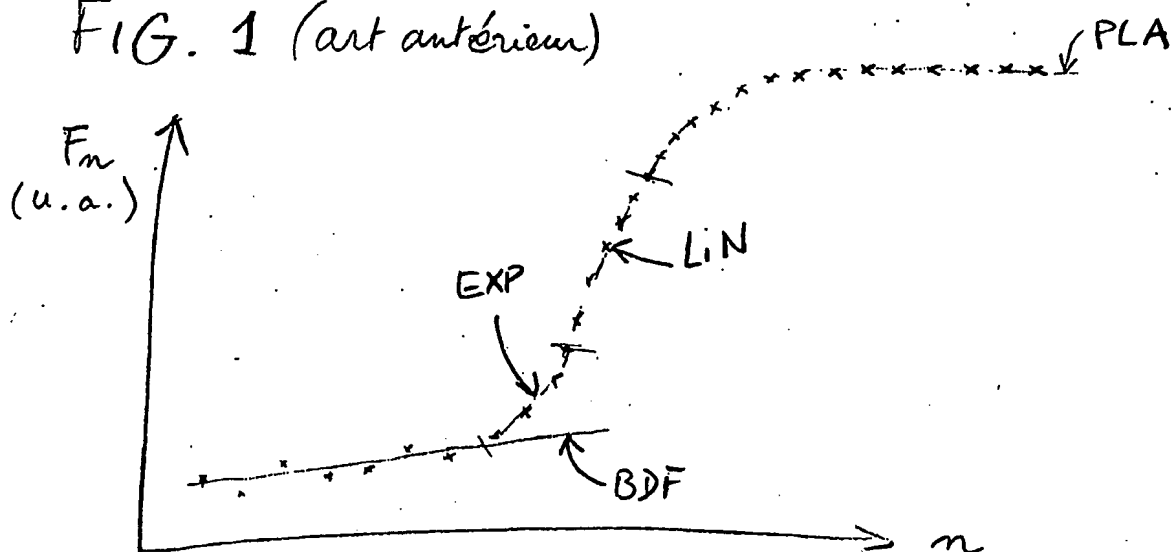


FIG. 2 (art antérieur)

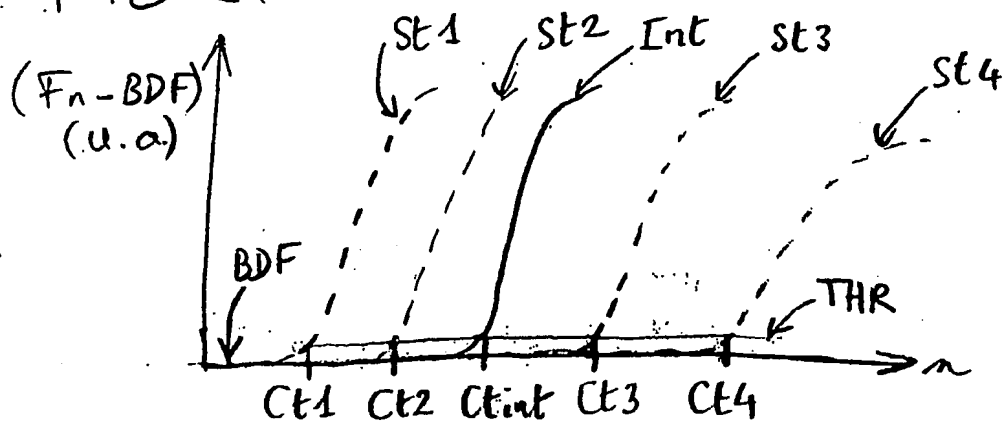
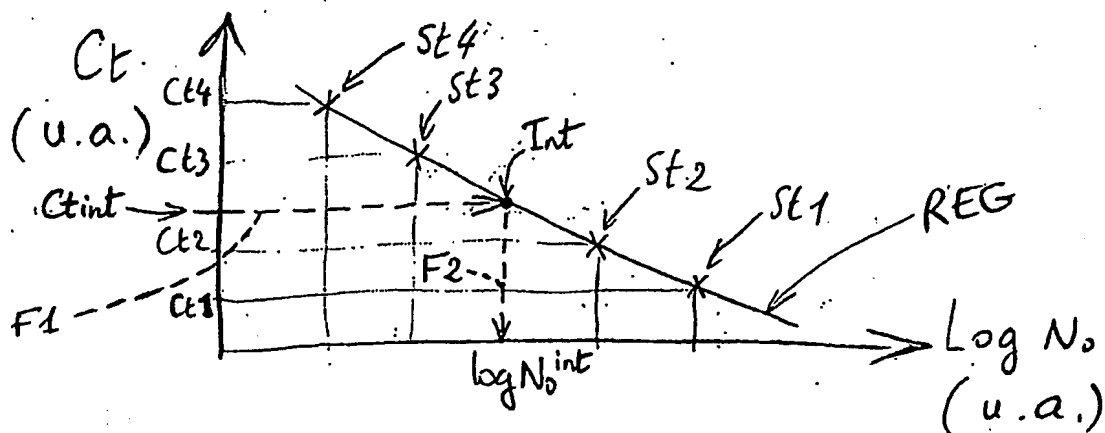
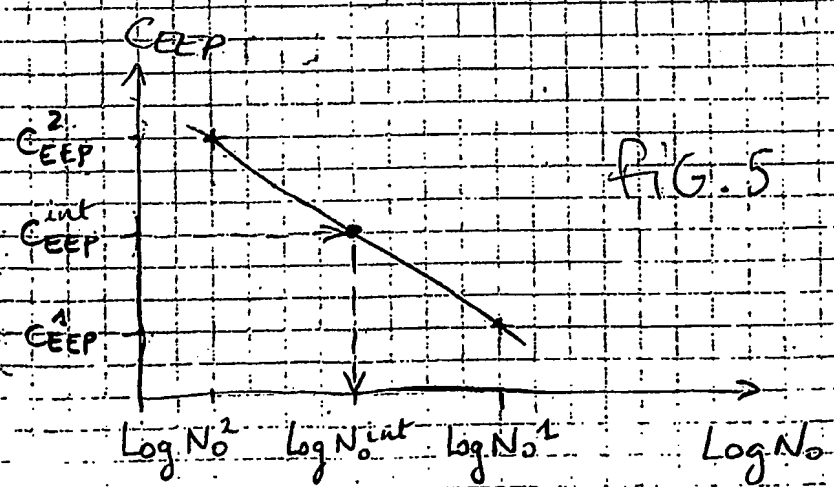
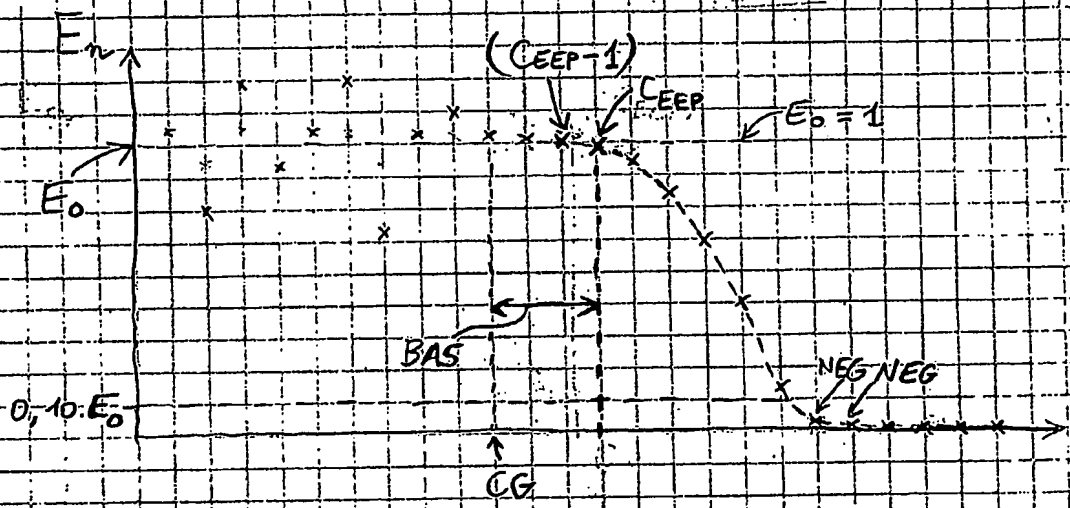
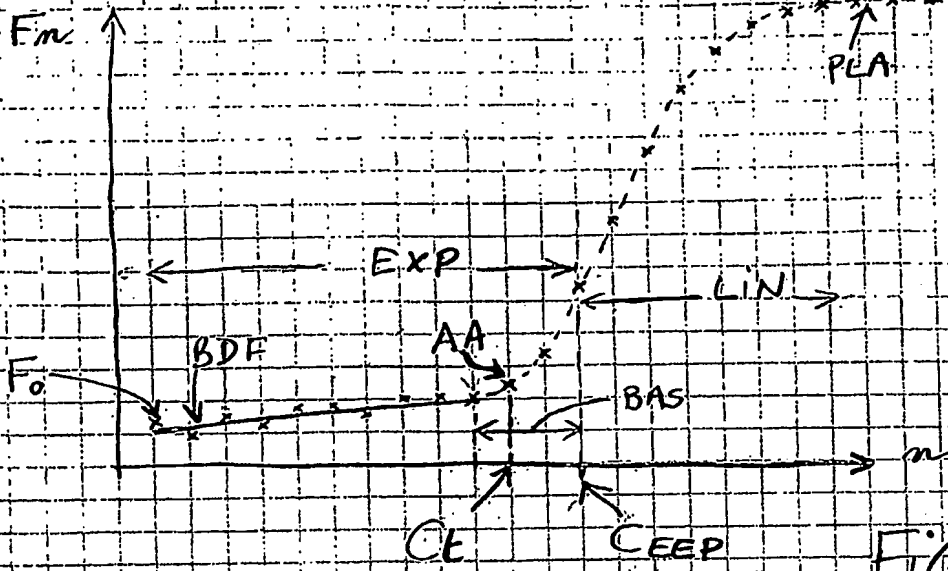


FIG. 3 (art antérieur)

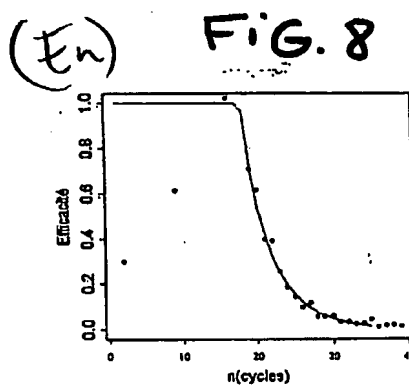
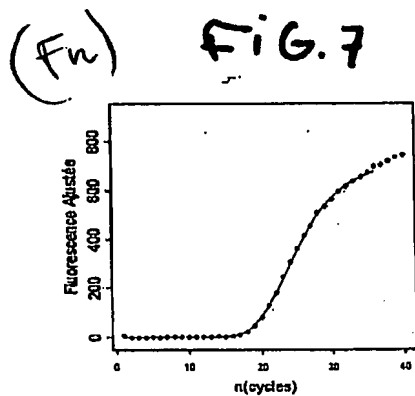
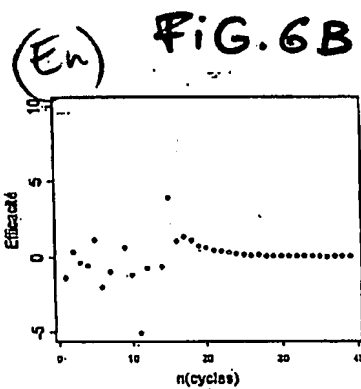
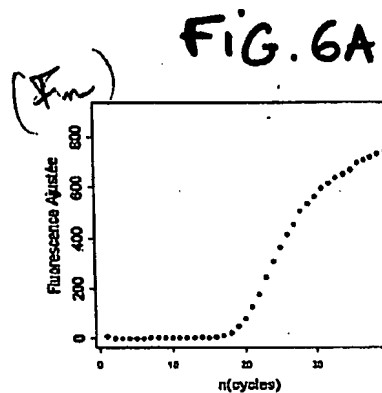


BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY

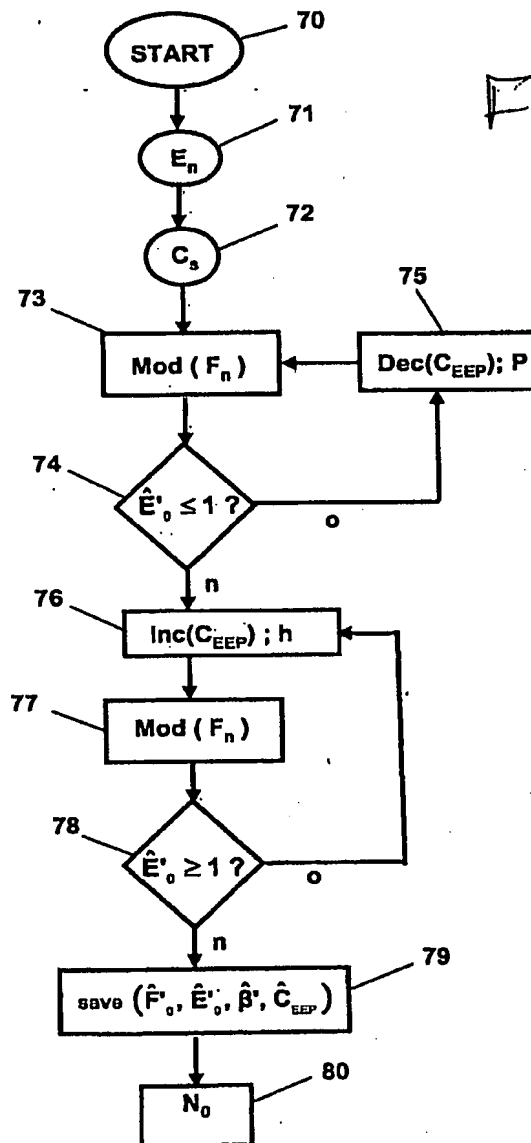
3/5



BEST AVAILABLE COPY

4/5

FIG. 9



BEST AVAILABLE COPY

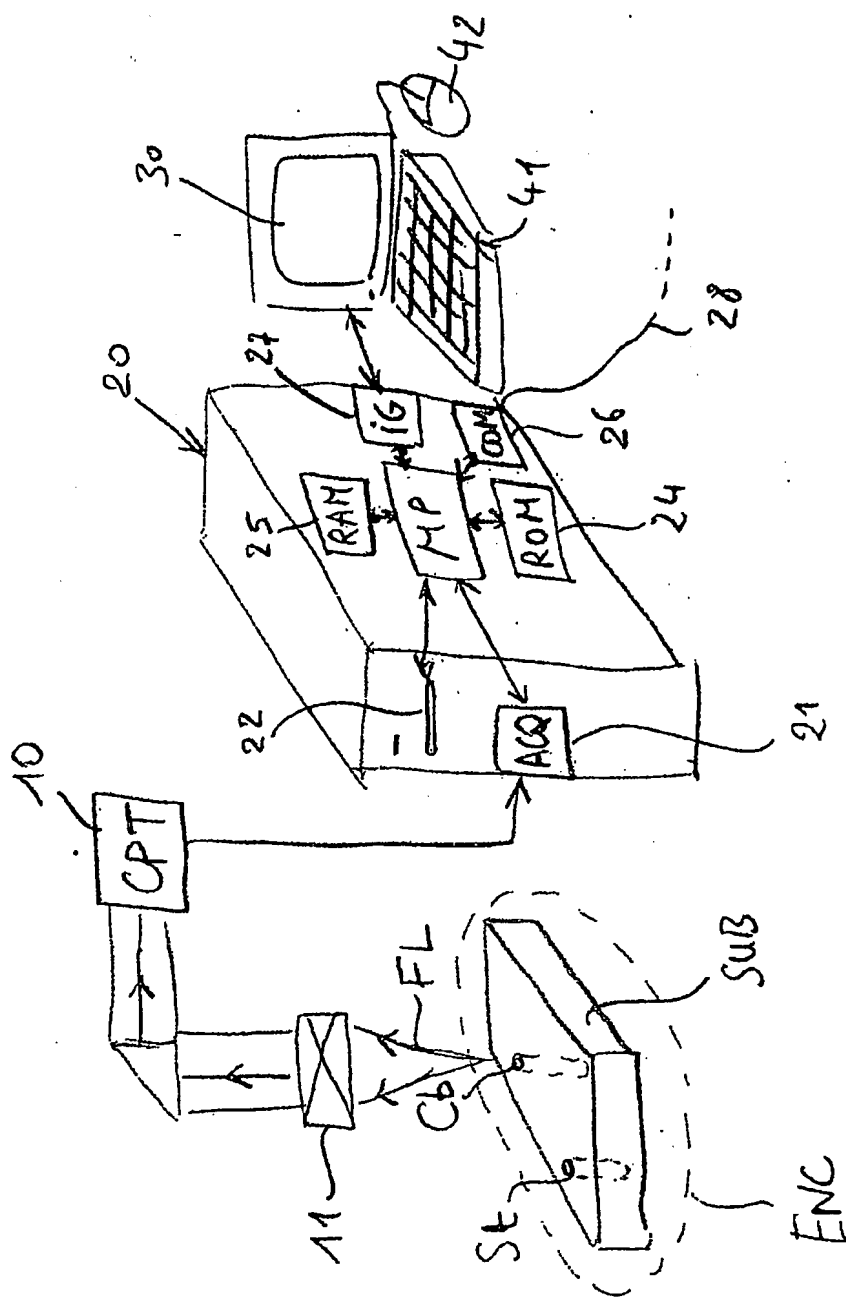


FIG. 40

BEST AVAILABLE COPY

10/574581

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP2005/013021

International filing date: 18 November 2005 (18.11.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0412471
Filing date: 24 November 2004 (24.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 March 2006 (07.03.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse